

Title	虚血性脳浮腫発生機構に於けるProstaglandinsの代謝について
Author(s)	新宮, 正
Citation	日本外科宝函 (1985), 54(5): 317-337
Issue Date	1985-09-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/208718">http://hdl.handle.net/2433/208718</a>
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

原 著

## 虚血性脳浮腫発生機構に於ける Prostaglandins の 代謝について

京都大学医学部脳神経外科学教室

新 宮 正

〔原稿受付：昭和60年6月20日〕

### Prostaglandin Metabolism in Ischemic Brain Edema

TADASHI SHINGU

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

#### Summary

Prostaglandin metabolism was studied in an incomplete ischemia and post-ischemic reperfusion model of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). After anesthetization with ether, cerebral ischemia was induced by clipping both the common carotid arteries. For reperfusion, the clips were removed without anesthesia. These animals were then grouped into three.

The first group (1-hour-occlusion group) was reperused after 1-hour-occlusion of the both common carotid arteries and were decapitated at the end of the occlusion, fifteen minutes, 3 hours or 6 hours after the reperfusion.

The second group (5-hour-occlusion group) was reperused after 5-hour-occlusion and were killed at the end of the occlusion, 3 hours or 6 hours after the reperfusion.

The third group (treated group) was pretreated with Dexamethasone or ONO-3144 (2-Aminomethyl-4-tert-butyl-6-propionylphenol hydrochloride), an imidazole derivative and a selective inhibitor of thromboxane synthetase. Dexamethasone (5 mg/kg) or ONO-3144 (5 mg/kg) was given intraperitoneally 30 minutes before the 5-hour-occlusion and these rats were killed at 3 hours after the reperfusion.

Cerebral water content was measured by dry-wet method. Horse-radish peroxidase (HRP) studies were done to examine blood-brain barrier function. Thiobarbituric acid reactive substance (TBA-RS) content was measured by Ohashi's method. Cerebral microvessels con-

Key words: Ischemic brain edema, Prostaglandins, Lipid peroxidation, Cerebral microvessels, Free radical.  
索引語：虚血性脳浮腫，プロスタグランディン，脂質過酸化，脳微小血管，フリーラジカル。

Present address: Laboratory of Clinical Studies, National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, Building 10, Room 3c-218, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20205, U.S.A.

taining arterioles, capillaries and venules were separated from the brain, using Brendel's method. The quality of the separation of microvessels was checked by microscopic examination. Tissues from seven animals were pooled and this specimen so-obtained was examined for cerebral microvessels. The contents of 6-keto-prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) and thromboxane  $B_2$  (TXB $_2$ ) of the whole brain, cerebral microvessels and Willis rings were measured by radioimmunoassay.

Although SHR became drowsy during the 1-hour-occlusion, the level of consciousness and motor activity gradually returned to normal. Neurological deficits were nil even 6 hours after the reperfusion and no rat died. Cerebral water content did not change significantly until 6 hours after the reperfusion. The HRP study showed that the function of the blood-brain barrier remained intact throughout the intra-ischemic and post-ischemic periods. The contents of TBA-RS in the whole brain did not change during the examined period. The contents of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  and TXB $_2$  in the whole brain had the same pattern of change and they increased 4 times and 1.5 times of the preischemic level respectively at 15 minutes after the reperfusion. But this increase was only transient and they recovered to the preischemic level at 3 hours after the reperfusion.

In the 5-hour-occlusion group, generalized convulsion, severe conscious disturbance and/or respiratory distress continued for over 3 hours. The mortality rate was 33.3 per cent. Even after the reperfusion, there was no recovery from the deficits. The cerebral water contents increased significantly. In HRP studies, the blood-brain barrier was disturbed at 3 and 6 hours after the reperfusion in the 5-hour-occlusion group. The contents of TBA-RS in the whole brain increased continuously after the reperfusion. The contents of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  and TXB $_2$  in the whole brain had the same changing pattern and they increased during the ischemic period 3 times and 2.5 times of the preischemic level respectively at the end of 5-hour-occlusion. But they recovered to the preischemic level at 15 minutes after the reperfusion and remained at this level up to 6 hours.

In the cerebral microvessels of rats in the 1-hour-occlusion group, 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  was suppressed during occlusion and also after reperfusion, there was a slight and transient recovery but no reversion to the preischemic levels. The suppression was more prominent both during and after the reperfusion in the 5-hour-occlusion group, as compared to the 1-hour-occlusion group. The content of TXB $_2$  in the cerebral microvessels increased in the 1-hour-occlusion group and also after the reperfusion, a maximum value being seen 3 hours after the reperfusion. Such an enhancement of TXB $_2$  metabolism in the microvessels during and after the occlusion was no longer observed in the 5-hour-occlusion group.

Both 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  and TXB $_2$  contents of the Willis rings were relatively lower than those of cerebral microvessels and their syntheses were also suppressed during occlusion and after reperfusion. However, there was a recovery close to the control levels.

Dexamethasone pretreatment led to a significant decrease in brain edema but the levels of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  exceeded those non-treated group, and TXB $_2$  levels at 3 hours after the reperfusion remained unchanged.

ONO-3144 pretreatment did not inhibit the brain edema, but did inhibit the increase of

TXB<sub>2</sub> synthesis of the microvessels and markedly increased 6-keto-PGF<sub>1α</sub> concentrations.

My experiment suggests that; (1) prostaglandin metabolism may be related to intra- and post-ischemic microcirculatory disturbances in the brain, (2) enhancement of the synthesis of prostaglandins during postischemic reperfusion is transient, yet the ischemic brain edema continues to progress. Thus, prostaglandins may not be a main factor related to ischemic brain edema, at least in rats.

## I 結 言

虚血性脳血管障害の臨床では、虚血自体による脳細胞障害よりも、虚血後早期に血流再開が起こった時の脳細胞障害、たとえば、脳浮腫による症状の方が、はるかに重篤であり、脳栓塞による死亡例の大部分が、これによることが知られている<sup>46)</sup>。実験的にも、完全虚血よりも、不完全虚血、または虚血後に血流再開を起こさせたモデルの方が、重篤な脳細胞障害や脳浮腫を招来せしめる<sup>43,47,72)</sup>。これらの事実から、虚血性脳損傷に続発する脳浮腫発生機構に関する生化学的研究は、従来の、脳損傷が単にエネルギー欠乏による細胞損傷<sup>61,90)</sup>のみでは説明しがたく、虚血一虚血後の血流再開を契機とする活性酸素による生体膜への障害を重視する方向<sup>19)</sup>へと変貌を遂げてきた<sup>91)</sup>。

脊髄損傷<sup>85)</sup>、けいれん重積<sup>8)</sup>、凍結損傷<sup>93)</sup>、脳梗塞<sup>23)</sup><sup>104)</sup>など、種々の原因による中枢神経系の障害に、脂質過酸化が重要な関与をしている事実が知られている。脳虚血による脂質過酸化の initiation が、どの段階で起こるかについては、議論の分かれるところであるが<sup>17)</sup><sup>52)</sup>脳虚血時の脳内脂質の変動は Phospholipase A<sub>2</sub> の活性化により、大量に遊離された Arachidonic Acid (AA) の挙動が、その病態に重要な意味を持っていることを示唆している<sup>80,105)</sup>。脳のリン脂質含有量は、他の臓器に比して著しく多量であり、さらに、リン脂質の脂肪酸の組成をみると、脳では、AA の割合が大きいことが特徴とされている<sup>6,87)</sup>。AA は生体活性物質であり、それ自体が脳浮腫を発生させることが知られており<sup>13)</sup>、また生理的に種々の活性を有する Prostaglandins (PGs) や Leukotriens の前駆物質でもある<sup>55)</sup>。したがって、虚血一血流再開によって AA の遊離、過酸化が起これば、PGs の合成が行なわれると考えられる<sup>100,102)</sup>。AA より PGs が合成される過程には活性酸素が関与しており<sup>76)</sup>、この過程や、その代謝産物など一連のアラキドン酸カスケードと虚血性脳浮腫との関連が注目される<sup>20,45)</sup>。Demopoulos et al<sup>20)</sup> は、脳の循

環における PGs の働きについて研究し、ネコの中大脳動脈血流遮断および、ネコの脊髄損傷モデルによる実験結果から、AA 代謝産物、特に Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) と Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 産生の不均衡が、中枢神経系の微小循環不全を惹起し、不可逆的細胞障害を増強する要因として重要であることを指摘している。

脳の虚血によって、PGs が産生されることが報告され<sup>9,17,30,31,32,83,89,92)</sup> しかも、血管に対して特に強力な生理活性を有する PGI<sub>2</sub> と TXA<sub>2</sub> とは、その合成の場に特異性が認められている<sup>63,70)</sup>。脳実質と脳血管とでは、虚血に対する反応が異なる<sup>2,69)</sup>と考えられ、また、血液一脳関門は脳微小血管の内皮細胞にあるとされている<sup>77)</sup>。

脳微小血管の内因性 PGs の測定報告は、著者が知り得た限りでは現在までなく、in vitro での脳血管の PGs 産生能を測定した報告として、Hagen et al (1979)<sup>36)</sup>、Abdel-Halim et al (1980)<sup>2)</sup>、Abdel-Halim et al (1980)<sup>2)</sup>、Maurer et al (1980)<sup>60)</sup>、および Goehlert et al (1981)<sup>33)</sup> をみるのみであり、虚血による脳微小血管の PGs 代謝の変動は全く未知であり、Demopoulos et al の仮説<sup>20)</sup>は推測の域を出ない。

本研究の目的は、1)虚血脳の病態に強く関与するとされるアラキドン酸カスケード産物、なかでも、互いに作用の拮抗する PGI<sub>2</sub> と TXA<sub>2</sub> の虚血性脳浮腫発生機構への関与を究明するために、脳微小血管自体の虚血に対する PGs 代謝の変動を、全脳と分離した形で明らかにし、2)脳の脂質過酸化と PGs 代謝との関連を、虚血性脳浮腫発生機構とのかかわりの中で総合的に検討することにある。

## II 方 法

### (A) 実験動物および虚血脳作製方法

平均血圧 185±2 mmHg, 15-17週齢、高血圧自然発症ラット (SHR) の雄に、軽いエーテル麻酔をかけ、仰臥位で実験用手術台に固定した。頸部正中線上に小

皮切を加え、両側総頸動脈を剥離、露出した。麻酔より覚醒するのを待って、Scoville clips を用いて、両側総頸動脈の血流を遮断した。

経時的に神経症候を観察のうえで、血流遮断1時間後(1時間虚血群)または、5時間後(5時間虚血群)に無麻酔で Scoville clips を解除して、血流を再開させ、1時間虚血群では血流遮断1時間後、血流再開15分後、3時間後および6時間後に断頭し、ただちに脳を採取した。また、5時間虚血群では、血流遮断5時間後、血流再開3時間後および6時間後に断頭によって脳を採取した。

#### (B) Dexamethasone, ONO-3144 の投与

これら無処置の群を対照群とし、脳虚血—血流再開に対する薬物投与の効果を知る目的で、薬物投与群として Dexamethasone (Dexa) 5 mg/kg および Thromboxane 合成酵素阻害剤 2-Aminomethyl-4-tert-butyl-6-propionylphenol hydrochloride, ONO-3144 (ONO) 5 mg/kg をそれぞれ血流遮断30分前に腹腔内に注射して、Dexa 投与群、ONO 投与群として対照群との差異を検討した。

#### (C) 脳微小血管の分離

脳微小血管の分離は、Brendel et al<sup>12)</sup> の方法を一部改変して行なった。

摘出した脳を、ただちに 4°C に冷却した pH 7.4, 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (0.32 M Sucrose, 0.1% Dimethyl sulphone oxide, 28 μM Indomethacin を含む) 中に浸し、脳幹部、小脳および大脳基底核部を除去した後に、Willis ring, 脳軟膜および脈絡叢を可及的に完全に除去した。SHR 7匹分の脳を1つの pool として、Teflon-pestle homogenizer により磨砕し、pore size 153 μm のナイロンメッシュで濾過したのち、残渣を再び磨砕し、同様に 153 μm のナイロンメッシュで再び濾過した。ナイロンメッシュに付着した脳微小血管を緩衝液で洗い流して採取し、4°C, 5000 rpm 15分間の遠心分離を行ない脳微小血管を分離した。得られた脳微小血管は、位相差顕微鏡により、その purity を確認し、PGs 測定に供した。

脳微小血管の分離にあたって、脳より剥離した Willis rings は実体顕微鏡下で可及的に血管周囲組織を除去して、PGs 測定に供した。

なお、脳微小血管の分離には、約1時間を要したが、この過程では、4°C 緩衝液中に、Dimethyl sulfone oxide および Indomethacin を加えて、摘出後の脂質

の過酸化および PGs の生成を阻止した。

#### (D) 測定

##### (1) 脳組織含水量の測定

摘出した脳を脳幹部で切断し、両側大脳半球を分割して、ただちに液体窒素中で凍結させ、湿重量を測定したのち一定重量になるまで凍結乾燥を行ない、乾燥重量を測定した。脳組織含水量(%)の算定は、以下の算定式によった。

$$(\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) \div \text{湿重量} \times 100 (\%)$$

得られたデータの推計学的有意差検定は、Student's t-test により、 $p \leq 0.01$  以下を推計学的有意差ありとした。

##### (2) Horse-radish peroxidase による血液—脳関門機能の検索

血流非再開群および血流再開後15分群では血流遮断30分前に、血流再開群(15分後のものを除く)では、断頭30分前に、大腿静脈より Horse-radish peroxidase (HRP) (Sigma type II) 50 mg/animal を注入し、断頭前に開胸して下行大動脈を結紮した後、左心室より 2% Glutal aldehyde 100 ml を注入し、同時に、上大静脈より脱血して脳実質の灌流固定を行なった。

凍結切片作製後に DAB (3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride) 反応を行ない、光顕的な HRP の血管外漏出の有無を検索した。

##### (3) Thiobarbiturate-reacting substance の測定

全脳の過酸化脂質含量を Thiobarbiturate-reacting substance (TBA-RS) を指標として、Ohkawa et al の方法<sup>14)</sup>により測定した。

採取した脳をただちに液体窒素中で凍結させ、秤量し、5 mM EDTA を含む冷生理食塩水で10%の磨砕液として、これに 8.1% Sodium dodecyl sulfate を加えて可溶化し、pH 3.5 の酢酸緩衝液中で 0.8% Thiobarbiturate と 95°C の条件下で60分間反応させて、生成した TBA-RS の蛍光強度を 515 nm の波長光で励起し、553 nm の波長光で測定した。

同一の磨砕液より Lowry 法<sup>15)</sup>によって蛋白量を測定して、TBA-RS 値は、単位蛋白質あたりの Malonaldehyde 量 (n mol/pg protein) として表示した。

##### (4) Prostaglandins の抽出

全脳、脳微小血管および Willis rings よりの PGs の抽出は、Spagnuolo et al (1979)<sup>12)</sup> の方法によった。すなわち、各試料に 100% Methanol を加えて磨砕し、4°C で 5000 rpm, 15分間遠心分離して、上清を分離採

取したのち、窒素ガス下で蒸発乾燥させた。(沈渣は、蛋白質量の測定に供した。)これを、pH 2.5, 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (28  $\mu$ M Indomethacin を含む) 1.0 ml に溶解し、Ethyl ether 2.0 ml を加えてよく混合したのちに、3000 rpm, 5 分間の遠心分離を行ない、上清の Ether 層を採取した。この操作を2回繰り返して行ない、Ether 層を窒素ガス下に蒸発乾燥させた。これに Ethyl acetate 1.0 ml を加え、よく溶解して、 $-20^{\circ}\text{C}$  で一晩 store した後に、窒素ガス下に蒸発、乾燥させて、pH 8.0, 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (28  $\mu$ M Indomethacin を含む) 500  $\mu$ l に溶解し、以下の Radioimmunoassay に供した。

#### (5) Prostaglandins の測定

PGs の測定は、 $\text{PGI}_2$  の安定代謝産物である 6-keto-Prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$  (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) および  $\text{TXA}_2$  の安定代謝産物である Thromboxane  $\text{B}_2$  (TXB $_2$ ) の2種類について、それぞれ、全脳(血管を含む)と脳微小血管の2種類の試料に対して、Radioimmunoassay 法により、組織内含有量を測定した。また、1時間虚血群では Willis rings についても同様の測定を行なった。

TXB $_2$  および 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  の Radioimmunoassay は、それぞれ New England Nuclear 社製 RIA キット NEK-007 および NEK-008 を用いて行なった。また、Methanol で磨砕した試料の沈渣中の蛋白質含有量を Lowry 法<sup>59)</sup>により測定し、PGs の含有量は、組織蛋白質 1 mg あたりの含有量 (pg/mg protein) として表示した。

### III 結 果

#### (1) 神経症候

両側総頸動脈の血流遮断によって、SHR は著るしい傾眠状態となり、血流遮断時間の延長とともに、意識障害の程度はさらに増悪した。

1時間虚血群 (n=119) : 血流再開によって傾眠状態

から経時的に活発さを回復し、血流再開6時間後には、何ら神経学的異常を示さず、全経過を通じて死亡例を認めなかった。

5時間虚血群 (n=168) : 血流遮断3時間目頃より、著るしく意識状態が低下し、全身けいれん、呼吸障害等が起こり、これらの重篤な虚血症状は血流再開によってほとんど回復を認めず、全経過を通じての死亡率は33.3% (死亡数56匹) であった。(なお、検体の採取にあたっては、断頭時までに死亡した個体、あるいは著るしく呼吸状態の悪化した個体は除外した。)

(1) NO 投与群 (n=61) : 対照群に比較して、神経学的差異が認められず、死亡率も同様であった。(死亡数20匹, 32.8%)

Dexa 投与群 (n=46) : 対照群に比較して19.6%と死亡率が低く、神経症状も軽度ではあるが改善がみられた。(死亡数9匹)

#### (2) 脳組織含水量

経時的な脳組織含水量の変化を Table 1. および Table 2. に示した。

1時間虚血群 : 血流再開6時間後まで有意の変化を認めなかった。

5時間虚血群 : 血流遮断中より脳組織含水量が増加し、血流再開によって、さらに経時的な増加を認めた。各時点における含水量の増加は、虚血前値と比較して、いずれも推計学的に有意であった。(p<0.001)

5時間虚血—血流再開3時間後の脳組織含水量の測定結果を Table 3. に示した。

Dexa 投与群 :  $78.53 \pm 0.08\%$  と対照群の  $79.92 \pm 0.06\%$  に比し、有意な含水量の低下を認めた。(p<0.001)

(1) NO 投与群 :  $79.61 \pm 0.06\%$  と対照群に比し有意の差を認めなかった。

#### (3) Horse-radish peroxidase の血管外漏出

血液—脳関門機能の破綻を示す指標としての、光顕

Table 1. Cerebral water contents in 1-hour-occlusion group

Experimental group	n	Water content	
Pre-operation	(6)	$77.79 \pm 0.09$	
1 hour after occlusion	(6)	$77.88 \pm 0.06$	n.s.
3 hours after reperfusion	(6)	$78.75 \pm 0.09$	n.s.
6 hours after reperfusion	(6)	$78.18 \pm 0.04$	n.s.

Water contents are expressed as percent, mean  $\pm$  SEM;  
n=number of animals, n.s.=not significantly different from pre-operation group

Table 2. Cerebral water contents in 5-hour-occlusion group

Experimental group	n	Water content	
Pre-operation	(6)	77.79±0.09	
5 hours after occlusion	(6)	79.65±0.09	P<0.001
3 hours after reperfusion	(6)	79.92±0.06	P<0.001
6 hours after reperfusion	(6)	80.18±0.05	P<0.001

Water contents are expressed as percent, mean±SEM;  
n=number of animals, p<0.001 is significantly different from pre-operation group

Table 3. Cerebral water contents in treated and non-treated groups at 3 hours after reperfusion in 5-hour-occlusion

Experimental group	n	Water content	
non-treated	(6)	79.92±0.06	
Dexamethasone (5 mg/kg)	(6)	78.53±0.08	p<0.001
(N)-3144 (5 mg/kg)	(10)	79.61±0.06	n.s.

Water contents are expressed as percent, mean±SEM;  
n=number of animals, n.s. is not significantly different and p<0.001 is significantly different from pre-operation group

的に観察した HRP の血管外漏出は、1 時間虚血群では、血流再開 6 時間後までの全経過を通じてこれを認めなかった。一方、5 時間虚血群では、血流再開 3 時間後および 6 時間後にこれをに認めた (Table 4)。

(4) 全脳 TBA-RS 含有量

1 時間虚血群：虚血中および血流再開後を通じて有意な変化を認めなかった。

5 時間虚血群：血流再開15分後より、TBA-RS の急激な増加を認め、6 時間後まで経時的に増加し、推計学的に有意であった。(3 時間後、p<0.05, 6 時間後、p<0.01) (Fig. 1)

(5) 脳微小血管の分離

分離された脳微小血管の電子顕微鏡像および位相差顕微鏡像をそれぞれ Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

この方法により、細動脈から毛細血管、細静脈レベルの血管が、形態的に良好な状態で分離されていることが確認された。

電子顕微鏡像では、血液—脳関門を構成する内皮細胞、基底膜、pericyte が良く保たれた状態で認められる。

(6) 全脳 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含有量

全脳の 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含有量の変化を Fig. 4 に示した。

1 時間虚血群：虚血中に軽度の増加を認めさらに血流再開によって急激に増加し、血流再開 3 時間後は急激に減少して 6 時間後にはほぼ虚血前の値に復した。

5 時間虚血群：虚血中に、虚血前の値の約 3 倍の増加を認めたが、1 時間虚血群に認められた血流再開後の急激な増加を示さず、逆に、急激に減少して、血流

Table 4. Extravasation of Horse-radish peroxidase

Experimental group	n	at the end of occlusion	3 hours after reperfusion	6 hours after reperfusion
1 hour-occlusion	(2)	(-)	(-)	(-)
5 hour-occlusion	(2)	(-)	(+)	(+)

Results are expressed as positive (+) or negative (-) findings of extravasation of Horse-radish peroxidase; n=number of animals

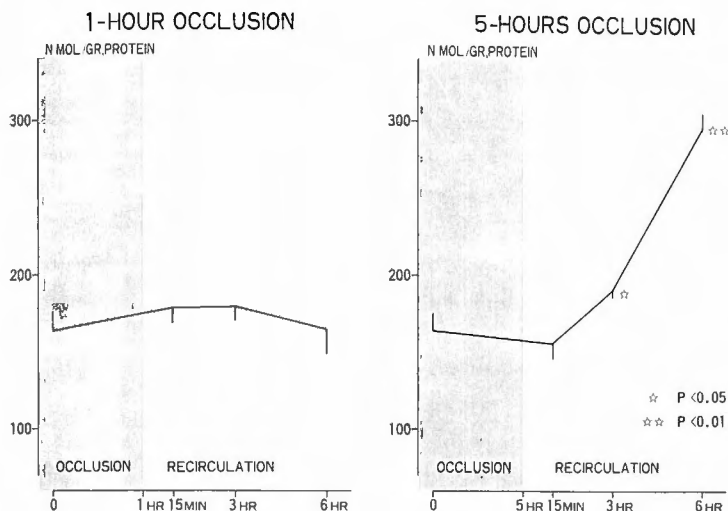


Fig. 1. TBS-RS Contents in Whole Brain

再開15分後には、虚血前の値に復し、その後の変動を認めなかった。

Dexa 投与群および ONO 投与群：1時間虚血では 6-kete-PGF<sub>1α</sub>の変動はほぼ対照群と同様の動きを示し

たが、虚血中、および、血流再開15分後に認められた増加は対照群と比較して両群ともに抑制されており、とくに、ONO 投与群に顕著であった。

一方、5時間虚血では、Dexa 投与群では対照群に



Fig. 2. Electron microscopic appearance of isolated cerebral microvessels





Fig. 3. Light microscopic appearance of isolated cerebral microvessels

比して大差なく、ONO 投与群は、虚血中の増加は軽度であったが、むしろ、血流再開後に増加する特異なパターンを示した。

(7) 全脳  $TXB_2$  含有量

全脳の  $TXB_2$  含有量の変化は、1時間虚血群、5

時間虚血群ともに全脳の 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  含有量の変動と類似している (Fig. 5)。

1時間虚血群：虚血中は虚血前の値とほとんど変化なく、血流再開によって急激に増加し、15分後には虚血前値の約4倍に増加するが、以後は急激に減少して、

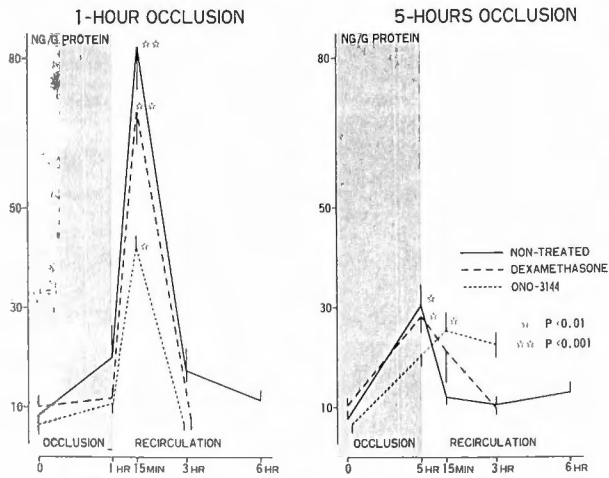
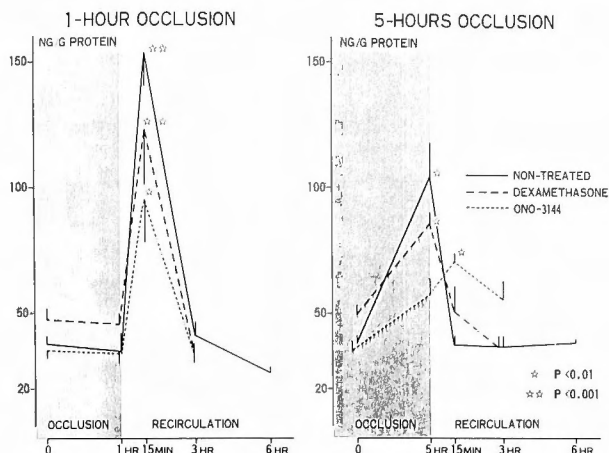


Fig. 4. 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  contents in whole brain

Fig. 5.  $\text{TXB}_2$  contents in whole brain

6時間後には虚血前の値に復した。

5時間虚血群：虚血中に、虚血前の値の約2倍の増加を示すが、血流再開後は、1時間虚血群とは逆に、急激に減少し、15分後には虚血前の値に復して、以後はこのレベルにとどまった。

Dexa 投与群および、ONO 投与群：ほぼ 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  について認められたと同様の薬剤投与の効果が認められた。1時間虚血群では、両群ともに血流再開後の増加を抑制したが、特に ONO 投与群で顕著であった。5時間虚血群では Dexa 投与群は、対照群に比較して、虚血中の増加をわずかに抑制したが、血流再開後の変化では大差がなかった。一方、ONO 投与群では、対照群で認められた虚血中の増加が抑制され血流再開後は、対照群とは逆に、さらに増加を示す特異なパターンを示した。

#### (8) 脳微小血管 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 含有量

脳微小血管 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  含有量の変動は、全脳とは全く異なる。その結果を Fig. 6 に示した。

1時間虚血群：虚血中に、虚血前の値の1/2以下に減少し、血流再開によって増加し、3時間後にピークに達したが虚血前の値までは至らず、以後は再び減少した。

5時間虚血群：1時間虚血群よりも虚血中の減少はさらに著しく、しかも、血流再開による増加を認めることなく虚血前の値よりも低値を示した。

薬剤投与群で5時間虚血—血流再開3時間後の結果を Table 5. に示した。

Dexa 投与群：対照群の約1.5倍の増加を示した。

ONO 投与群：対照群の約3.5倍と Dexa 投与群よりさらに著明な増加を示した。

#### (9) 脳微小血管 $\text{TXB}_2$ 含有量

脳微小血管  $\text{TXB}_2$  含有量の変動を Fig. 7 に示した。

1時間虚血群：6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  とは異なり、虚血中に増加し、血流再開後早期に一時的な減少を示すが、以後は急激に増加し、3時間後にピークに達して、虚血前の値の2倍強の高値を示し、以後再び減少した。

5時間虚血群：虚血中の減少が著しく、血流再開

Table 5. Inhibition of prostaglandin syntheses in cerebral microvessels at 3 hours after reperfusion in 5-hour-occlusion groups

Experimental group	6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$	$\text{TXB}_2$
non-treated	302	509
Dexamethasone (5mg/kg)	475 ( -57.3)	499 ( +2.0)
ONO-3144 (5 mg/kg)	1,051 ( -248.0)	325 (+36.1)

Results are expressed as pg/mg protein;

( ) means percent inhibition by treatment from the control value of non-treated group

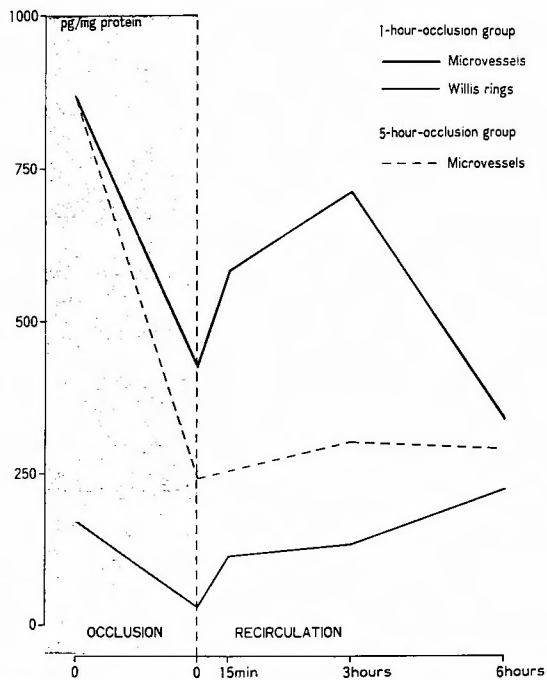


Fig. 6. 6-keto-PGF<sub>1α</sub> contents in cerebral microvessels and Willis rings

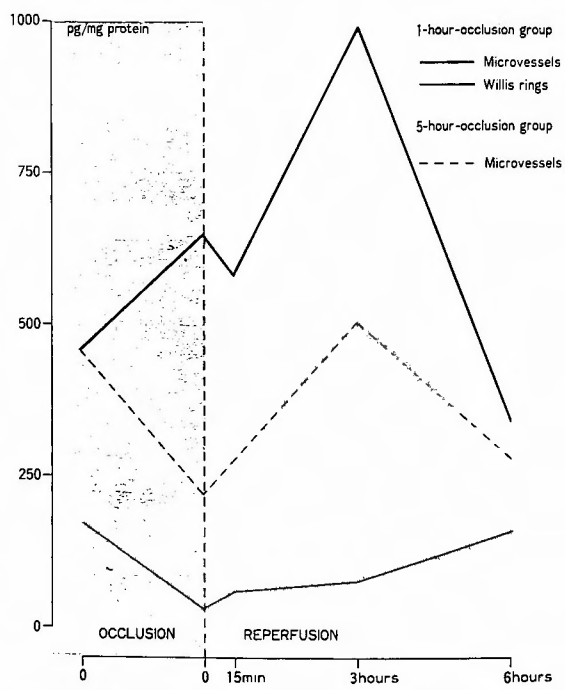


Fig. 7. TXB<sub>2</sub> contents in cerebral microvessels and Willis rings

後には増加して3時間後にはほぼ虚血前の値に復するが、以後は再び減少を示した。

薬剤投与群について、5時間虚血—血流再開3時間後の結果を Table 5 に示した。

Dexa 投与群：対照群とほぼ等しい値を示した。

(i) NO 投与群：対照群の約40%の減少を示した。

#### (10) Willis rings の PGs 含有量

1時間虚血群の Willis rings の 6-keto-PGF<sub>1α</sub> および TXB<sub>2</sub> 含有量の変動を Fig. 6 および Fig. 7 に示した。

虚血前の Willis rings 中の 6-keto-PGF<sub>1α</sub> および TXB<sub>2</sub> 含有量は、いずれも脳微小血管に比較して、それぞれ約1/4、および約1/2と低値を示した。

また、虚血による変動は、6-keto-PGF<sub>1α</sub>、TXB<sub>2</sub> ともにほぼ同様の变化を示し、虚血中に減少し、血流再開によって経時的に増加して、血流再開6時間後には、ほぼ虚血前の値に復した。

## IV 考 察

### (a) 神経学的経過および脳浮腫発生からみた脳虚血モデルの検討：

虚血性脳浮腫の実験モデルとして如何なる動物を用い、如何なる虚血を作成するか、ということは重要である<sup>29)</sup>

これまで、実験の方法、あるいは実験の目的に応じて、種々の実験モデルが使用されてきたが、著者も本実験に用いた SHR の両側総頸動脈血流遮断モデルは、軽い麻酔により、頭蓋内に侵襲を加えることなく、脱血などによる低血圧の負荷等の人為的操作を要せず、両側大脳半球に比較的均質な虚血が得られ<sup>15)</sup>、血流の再開が容易に行なわれ、しかも開頭が容易で迅速な試料の採取ができるという諸点で適当なモデルであると考えられる。しかし、脳微小血管の採取に際しては、1匹あたりの収量が少なく、PGs の測定のためには、7四分をひとつの pool としなければならないという短所があった。そこで PGs の測定にあたっては、測定操作の誤差を小さくするために、試料を3分割し、3ケの試料として測定を行なった。

SHR の両側総頸動脈血流遮断は、両側大脳半球の血流量を著しく低下せしめる。

Fujishima et al<sup>26)</sup> は、両側総頸動脈血流遮断によって、脳血流量は通常の17%にまで減少することを報告している。

一般に、脳細胞が不可逆的变化に陥る局所脳血流量

の限界点としては、10-20 ml/100 g/min とされており<sup>14,16)</sup>、SHR の両側総頸動脈血流遮断による虚血の程度はこのレベルに達しているといえる。

著者の実験結果では、1時間の両側総頸動脈血流遮断によって、SHR は神経学的に、明らかな虚血状態を示したが、血流再開によって、経時的な回復を示し、1時間虚血群では、血流再開6時間後までの全経過を通じて死亡するものは認められなかった。

組織学的にも、Ogata et al<sup>73)</sup> の報告では、SHR の両側総頸動脈結紮により、病理学的に高率に広汎な脳梗塞巣が認められ、脳組織含水量も、1時間の結紮では変動が認められないのに対して5時間の結紮では有意の増加が認められている。

著者の結果では、脳組織含水量は、1時間虚血群では有意の増加が認められず、また、血液—脳関門の機能の指標として用いた HRP による検索によっても、血流遮断中および血流再開6時間後までの全経過を通じて血管外漏出を認めず、血液—脳関門機能は正常に保たれており、脳組織含水量が増加しない事実を裏づけている。したがって、1時間の血流遮断では、SHR は血流遮断中に脳虚血の症状を呈するが、可逆的であり、血流遮断中および血流再開後を通じて、不可逆的な脳虚血の変化をきたしていないと考えられる。

一方、5時間虚血群では、血流遮断時間の延長とともに、SHR は経時的な神経症状の悪化をきたし、血流遮断後3時間を経過する頃より、けいれん発作、呼吸障害などの重篤な虚血症状を呈し、これらの症状は血流再開によっても改善がなく、血流再開6時間後までの死亡率は33.3%に達した。

脳組織含水量は、5時間の血流遮断中、すでに有意の増加を示し、血流再開によって、さらに経時的な増加が認められ、血流再開3時間後および6時間後のいずれの時点でも虚血前の値に対して推計学的に有意であった。(p<0.001)

また、5時間虚血群では、血流再開3時間後および6時間後に HRP の血管外漏出が観察された。したがって、血液—脳関門機能の破綻および脳組織含水量の増加と、神経症状の推移の一致がみられた。

これらの事実より、著者の用いた SHR の両側総頸動脈血流遮断モデルでは、1時間の血流遮断は可逆的な虚血性変化を、5時間の血流遮断は不可逆的な虚血性変化を生ぜしめていると考えられる。

### (b) PGs 代謝と脳浮腫について

脳組織が AA を基質として、種々の PGs を合成す

ことはよく知られており、その合成能を測定した報告としては、Wolfe et al (1976)<sup>100)</sup>, Bosio et al (1976)<sup>101)</sup>, Wolfe et al (1976)<sup>102)</sup>, Abdel-Halim et al (1977)<sup>1)</sup>, Abdel-Halim et al (1980)<sup>2)</sup>, Abdel-Halim et al (1980)<sup>3)</sup> 等があり種々の生理的作用が推測されているが、病的状態、特に、脳虚血時の PGs 代謝の変動、およびその意義については、いまだ明きらかでない。

#### <PGs 測定法およびその問題点>

PGs の測定法には、種々のものが知られており (1) Bioassay 法<sup>65)</sup>, (2) Radioimmunoassay 法 (RIA 法)<sup>57)</sup>, (3) Gas chromatography-Mass spectrometry 法 (GC-MS 法)<sup>71)</sup> 等が利用されているが、それぞれ問題点を有している<sup>34)</sup>。

Bioassay 法は、感度が高く、試料の分離、精製は迅速で容易であるが、定量性に乏しく、定性的でない、という短所がある。

一方、GC-MS 法は、感度、定性性ともにすぐれているが、試料の分離、精製が複雑であり、多数の試料の迅速な解析には適さない。

これらに対して、RIA 法は、感度は十分であり、微量の試料の測定も可能であって、また、多数の試料を同時に処理し得るという長所があるが、定性性については、用いる抗体の交叉反応性に依存しており、問題が残されている。今回著者の用いた抗体は、交叉反応性が、6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub> ともに、他の PGs に対して 0.01% 以下と十分に低く、定性性を十分に満足していると考えられた。また、RIA 法と GC-MS 法とを同時に用いて比較を行なった Spagnuolo et al (1979)<sup>92)</sup> では、ともに同じ程度の PGs 含有量の測定結果を得ており、著者の実験の如く、多数の試料について、定性性、定量性ともに信頼するに足る結果を得る方法としては、RIA 法が適当であると考えられた。

しかしながら、PGs 測定上で最も問題となるのは、測定法の選択よりも、むしろ、測定試料を如何にして固定、精製して測定するかという点である。PGs、とくに、著者が測定の対象とした PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> は、とくに極めて寿命が短く、容易に代謝を受けやすく、したがって、生検材料をただちに凍結したとしても、その測定結果が、生体の中での真の PGs の量を反映しているか否かは疑問であるとされている<sup>36,67)</sup>。このような試料の採取から測定にいたるまでの過程での PGs の変動を最小限に抑えるために、Gr  n et al<sup>35)</sup> は、試料の磨砕は凍結したまま、PGs 合成酵素の阻害剤を加えた有機溶剤の中で行なわなければならないと指摘

している。

著者の実験では、50 mM の Indomethacin を加えた Methanol 中で磨砕し、全脳については、断頭後可及の早期に液体窒素により凍結し得たが、脳微小血管の分離は、その分離過程で緩衝液中に Indomethacin および Dimethyl sulphone oxide を加えてはいるものの、この過程に要した約 1 時間の間は、凍結することが不可能であるため、人為的な影響を考慮する必要がある。Jouvenaz et al<sup>48)</sup> は、このような場合、測定された値は、in situ における PGs の真の含有量を示すよりは、むしろ、PGs 合成能を示すと考えるべきであると述べている。したがって、著者の測定した脳微小血管中の 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub> の含有量は、断頭時の PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> それぞれの真の含有量を示すものではなく、むしろ、PGs 合成酵素の活性や、反応条件、基質としての AA の存在等、PGs 合成に影響を与える環境因子の状態をも含んだものを示していると考えらるべきである。

脳微小血管の PGs 代謝に関するこれまでの知見が、血管壁に存在する PGs 含有量の測定ではなく、単に、PGs の産生能を測定するにとどまっていた<sup>2,3,33,38,60)</sup> ことは、このように、測定された結果が種々の因子の複雑な作用の結果としてあらわれるためであるが、脳虚血にともなう PGs 代謝を経時的に動的にとらえるためには、“比較的”ではあっても、PGs の含有量を直接に測定する必要があると考えられる。

#### <全脳の PGs 代謝について>

全脳の PGs 代謝の変動を、虚血との関連で検討した報告は近年増加しており、Gaudet & Levine (1979)<sup>30)</sup>, Spagnuolo et al (1979)<sup>92)</sup>, Gaudet et al (1982)<sup>31)</sup>, Gaudet & Levine (1980)<sup>32)</sup>, Crockard et al (1982)<sup>16)</sup>, Shoami et al (1982)<sup>89)</sup> および Bhakoo et al (1984)<sup>9)</sup> 等がある。これらの報告は、脳虚血モデルや、測定の対象とした PGs がすべて異なっており単純な比較をして論ずることは危険であるが、実験の設定条件が共通している (A) Gaudet et al<sup>30)</sup>, (B) Crockard et al<sup>16)</sup>, (C) Bhakoo et al<sup>9)</sup> の報告では、いずれも虚血モデルとして、Mongolian gerbil の両総頸動脈血流遮断を用いて、1 時間虚血後の PGF<sub>2α</sub> および PGE<sub>2</sub> の変動を検討しているので、これらを比較すると、PGF<sub>2α</sub> は、(A) では変化がなく、(B) および (C) では増加を認めている。一方、PGE<sub>2</sub> は、(A) および (B) では変化がなく、(C) では軽度の増加を認めており、三者それぞれが異なった結果を示している。

著者が測定の対象とした PGI<sub>2</sub> および TXA<sub>2</sub> の両

者の代謝の変動を同時に検討した報告は少なく、Gaudet et al<sup>31)</sup> および Shoami et al<sup>89)</sup> があるのみである。脳虚血モデルとして、前者は、Mongoril gerbil を用いて、5分間の両側総頸動脈血流遮断を行ない、後者は Albino rat を用いて、15分間の両総頸動脈血流遮断に、脱血による低血圧を加えている。したがって Shoami et al<sup>89)</sup> も述べている如く、これらの実験モデルの動物の種類と、脳虚血の程度が互いに異なっているために、単純な比較はできないが、前者では  $\text{PGI}_2$ 、 $\text{TXA}_2$  の合成の増加は、虚血中には起こらず、虚血後の血流再開によって急激に起こっており、 $\text{PGI}_2$  と  $\text{TXA}_2$  との間に代謝の変動の差がなかったとしているのに対して、後者では、 $\text{PGI}_2$  は虚血中に増加し、血流再開によって減少したが、 $\text{TXA}_2$  は虚血中から経時的に増加し、血流再開後もなお一層の増加を認め、 $\text{PGI}_2$  と  $\text{TXA}_2$  との間に代謝変動の差があったとしている。

著者の結果では、1時間虚血群では  $\text{PGI}_2$ 、 $\text{TXA}_2$  とともに虚血中の増加は軽度であって、血流再開後急激に増加しており、Gaudet et al<sup>31)</sup> の報告に類似した結果であった。しかし、5時間虚血群では  $\text{PGI}_2$ 、 $\text{TXA}_2$  とともに虚血中に軽度の増加をみるのみで、血流再開による増加は認められなかった。すなわち、著者の結果では、虚血による全脳の PGs 代謝の変動は、PGs の種類による特異性よりはむしろ、虚血の程度により強い影響を受けていると考えられる。

PGs の前駆物質としての AA は、虚血によって、極めて早期に大量に放出されることが知られており<sup>80, 105)</sup>、これが、すみやかに酵素的な代謝を受けるとすれば、PGs が早期に増加することが予想される。しかし、これは、あくまで、AA が酵素的に代謝され得る状況がととのっている場合であって、虚血の程度によっては、必ずしもこのような経路による AA の代謝が行なわれず、特に虚血中では、酸素が欠乏しているために Cyclooxygenase による酸素の添加が起こらないなどの種々の修飾を受けると考えられる。また、今回は検討していないが、AA の酵素的代謝のもう一つの経路、すなわち Lipoxygenase による代謝系路との関連も考慮されなければならない<sup>97, 98)</sup>。

Gaudet et al<sup>31)</sup>、Shoami et al<sup>89)</sup> および著者の1時間虚血群、5時間虚血群がそれぞれ全く異なった PGs 代謝の変動をきたしているのは、モデルに用いた動物の種差、そして、虚血の程度の差によると考えられる。また、著者の実験結果で、1時間虚血群と5時間虚血

群とで、全脳の PGs 代謝の変動が全く異なっているのは、合成系がたがいに異なる脳血管系および脳組織が、全脳として一緒に含まれているために、これらの組織における PGs 合成酵素の虚血に対する特異性がマスクされ、むしろ基質としての AA および、代謝過程に必要とされる酸素の供給状況をより強く反映した結果であると考えられる。

#### 〈脳微小血管の PGs 代謝について〉

$\text{PGI}_2$  および  $\text{TXA}_2$  はそれぞれ血管壁および血小板で活発に合成されており、血流調節に対する関与が考えられている<sup>41, 99)</sup>。

現在まで、脳の血管における内因性 PGs 測定の報告はなく、したがって、虚血時の PGs 代謝が血管では如何なる変動を示すかについては全く未知である。

脳の血管系における PGs 代謝の報告としては、Hagen et al (1979)<sup>38)</sup> が、bovine の脳主幹動脈を用いて、AA との3時間の incubation により、 $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGD}_2$  および  $\text{TXB}_2$  の産生をみており、Maurer et al (1980)<sup>60)</sup> は、同様に bovine の脳微小血管を用いて30分間の incubation を行ない、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 $\text{PGE}_2$  および  $\text{TXB}_2$  が産生されることを示している。また Abdel-Halim et al (1980)<sup>2)</sup> および Abdel-Halim et al (1980)<sup>3)</sup> は、それぞれ rat およびヒトの脳血管を用いて、30分間の incubation により、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  の産生を認めている。また、Goehrlert et al (1981)<sup>33)</sup> は、rat の脳微小血管を用いて、10分間の incubation により 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGE}_2$  および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  の産生を認めている。これらの報告は、いずれも、in vitro で incubate して血管の有する PGs の合成能を測定しているにすぎず、その生理的意義については、さらに検討が必要である。

著者の行なった脳微小血管の PGs の測定は、測定された PGs 自体が、脳微小血管の in vitro での PGs 合成能ではなく、虚血によって起こった PGs の代謝の変動を反映しており、しかも in vivo で脳虚血—血流再開を起こさせた結果であるということで、従来全く知られていなかった虚血にともなう脳微小血管の PGs 代謝を明きらかにするものである。

脳微小血管における不完全虚血—血流再開に対する  $\text{PGI}_2$  および  $\text{TXA}_2$  代謝の特徴は、第1に、脳虚血前状態では、脳微小血管の  $\text{PGI}_2$  合成が  $\text{TXA}_2$  の合成に比較して、より優位であることである。この結果は、脳微小血管を用いて incubation による PGs 合成能を検討した Maurer et al<sup>60)</sup>、Goehrlert et al<sup>33)</sup> の報告で示

された、 $\text{PGI}_2$  合成能が他の PGs よりも脳微小血管では圧倒的に優位であった事実と一致している。

Pickard et al<sup>75)</sup>, Harris et al<sup>42)</sup> らは Indomethacin (IM) の投与による脳血流量の減少を実験的に報告しており、これは、IM によって Cyclooxygenase 活性が阻害された<sup>24,67)</sup>ために、脳微小血管での  $\text{PGI}_2$  優位性が保たれなくなり、結果的に、脳微小血管が収縮し、脳血流量の低下が起こるためと考えられる。また、著者の実験結果では、脳主幹動脈 (Willis rings) 壁中の  $\text{PGI}_2$  と  $\text{TXA}_2$  は、脳微小血管に比較して、いずれも含有量が小さく、それぞれ脳微小血管の20%および38%となっており、その比率も、脳微小血管の1:0.52に対して、脳主幹動脈では1:1と  $\text{PGI}_2$  の比率が相対的に小さくなっている。これは、脳血流量制御の場としての脳微小血管に  $\text{PGI}_2$  が多量に存在し、血管収縮作用を有する  $\text{TXA}_2$ <sup>42)</sup> と血管拡張作用を有する  $\text{PGI}_2$ <sup>66)</sup> とが、相反する作用によって脳血流量の調節に関与していることを示唆している<sup>3,96)</sup>。

第2に、脳虚血にともなう脳微小血管の PGs 代謝の変動に関して、 $\text{PGI}_2$  と  $\text{TXA}_2$  との間に代謝の差があって、全く異なった変動を示していることである。

すなわち、1時間の虚血中には、 $\text{PGI}_2$  は減少するのに対して、 $\text{TXA}_2$  は増加し、脳微小血管でのこれらの存在比は1:1.51と  $\text{TXA}_2$  が優位となり、虚血前の状態と全く逆転している。したがって、脳微小血管は収縮する方向に傾き、脳血流量は一層減少するものと考えられる。Prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) から合成される一方の  $\text{TXA}_2$  が虚血中に合成が促進され、他方の  $\text{PGI}_2$  の合成が抑制される機序は明らかではないが、 $\text{PGI}_2$  合成酵素が Hydroperoxide によって選択的に抑制される<sup>40,64)</sup>との報告があり、不完全脳虚血中に発生する Hydroperoxide が関与している可能性が示唆される。

5時間の虚血中には、 $\text{PGI}_2$  の合成は1時間虚血よりさらに低下するとともに、 $\text{TXA}_2$  の合成も、1時間の虚血とは逆に低下を示している。 $\text{PGI}_2$  と  $\text{TXA}_2$  との存在比は1:1となり、虚血前の状態に比較して、 $\text{TXA}_2$  の増加が著明だが、この時点では脳組織含水量の場合が認められ、生理的な状態を逸脱していると考えられる。

AA が Cyclooxygenase により PG endoperoxide に変わる反応は酸素添加反応であり、酸素を必要とする<sup>66,70)</sup>。5時間におよぶ長期の血流遮断では、脳浮腫による組織圧の上昇や、虚血中に合成された  $\text{TXA}_2$  が、

血管攣縮、sludging などの微小循環不全を惹起するであろう<sup>21,84)</sup> こともあって、脳血流を一層減少させ、酸素の供給が減少し、より完全虚血に近づくため、AA の酵素的過酸化が抑制される結果、 $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TXA}_2$  ともにその合成が低下すると思われる。したがって、このような高度の虚血状態では、1時間虚血中に認められた PGs 合成酵素間の特異性はマスクされ、基質としての AA や、酸素の供給状態をより強く反映していると考えられ、全脳にみた PGs 代謝の変動と同様のことが考えられる。

第3に、虚血後の血流再開による変化でも、 $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TXA}_2$  代謝間に相異が認められることである。1時間血流遮断群では、 $\text{TXB}_2$  は血流再開後3時間目に216%と虚血前の値と比較して著るしく高い値を示すのとは対照的に、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  は、血流再開後も虚血前の値に復することなく、虚血中、および虚血後の血流再開の全経過を通じて、その合成が抑制されたままとっている。

5時間の血流遮断後の血流再開でも、 $\text{TXB}_2$  は3時間後にピークを有する増加をみるが、1時間の血流遮断後の血流再開時にみられた大幅な増加を示さない。

6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ :  $\text{TXB}_2$  の比率が、血流遮断中と同様に、1時間および5時間の血流遮断後の血流再開において、いずれも  $\text{TXB}_2$  増加の方に向かっているのは、それぞれの分解の差ではなく合成の差、すやわち、 $\text{TXA}_2$  合成優位へと変化していることを示しており、 $\text{PGI}_2$  合成酵素に比較して、 $\text{TXA}_2$  合成酵素は、虚血あるいは虚血後の血流再開による阻害を受けにくいと考えられる。

5時間の血流遮断後の変化は、いずれにしても生理的反応とは考え難く、血管壁の虚血による2次的変化を反映しているものと思われる。

これらの事実を総括すれば、脳微小血管における PGs 代謝は、平常時は  $\text{PGI}_2$  合成優位であるが、虚血によって  $\text{TXA}_2$  合成優位へと変化し、血流再開によって、さらにこの傾向が增強されるが、この変化は一過性である。しかし、虚血の程度が強くなると、もはや、AA の酵素的酸化が起こらなくなり、PGs 合成は全体として低下し、ことに  $\text{PGI}_2$  合成は  $\text{TXA}_2$  合成に比較して、より強い阻害を受けるといえる。

脳虚血後の血流再開にともなう現象としてふるくより知られているものに“no-reflow phenomenon”があり<sup>8)</sup>、この原因として、血管内皮の膨化による内腔の狭小化、血管自体の攣縮、あるいは血小板凝集によ



る sludging などが指摘されてきた<sup>21,82)</sup>。そして、この現象が、虚血よりの脳細胞の回復を遅延させ、あるいは、さらに脳細胞障害を増強すると考えられている<sup>44,59)</sup>。この過程に PGs が関与し、しかも、著者の結果に示される如く、脳微小血管壁での PGs 代謝の変動が、このような脳微小循環を阻害する方向に導くことが考えられることから、虚血性脳細胞障害の予防あるいは治療に対して、PGs、特に  $\text{PGI}_2$ <sup>7,37,39,50)</sup> を用いたり、PGs 合成酵素阻害剤<sup>28,39,42,45)</sup> を用いる試みがなされている<sup>68)</sup>。

Gryglewski et al (1983)<sup>37)</sup> は虚血性脳血管障害の患者に  $\text{PGI}_2$  を用いて治療し、神経症状の改善をみ、有効であったと報告している。Awad et al (1983)<sup>7)</sup> および Kerckhoff et al (1983)<sup>50)</sup> は、ネコの虚血モデルに対して  $\text{PGI}_2$  を用いたが、いずれの報告でも、虚血後の脳血流低下に対する改善効果を認めていない。また、Furlow & Hallenbeck (1978)<sup>28)</sup> は、イヌの虚血モデルに対する IM の虚血後の血流低下改善効果を報告している。Ianotti et al (1981)<sup>45)</sup> は、Mongolian gerbil の脳虚血モデルを用いて、IM, Dexamethasone の抗浮腫効果を検討し、これらはいずれも脳血流量には変化を与えなかったが、5-7 ml/100 g/min 程度の低い血流量の虚血果では、脳組織含水量の増加の抑制効果を認めている。これに対して、Harris et al (1982)<sup>42)</sup> は baboon の中大脳動脈閉塞モデルを用いて、IM の投与は虚血による脳組織含水量の増加を一層増強し、脳浮腫を増悪せしめたと報告している。

虚血性脳細胞障害に対する PGs 合成酵素阻害剤の効果を全脳の PGs を測定し、PGs 代謝の変動とあわせて検討した報告では、Gaudet & Levine (1979)<sup>30)</sup> は、Mongolian gerbil の両側総頸動脈血流遮断モデルに IM, Aspirin および Dexamethasone を用いた結果、IM, Aspirin は血流再開後の  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$  および  $\text{TXB}_2$  の増加を抑制し、locomotion activity の改善効果を認めたのに対して、Dexamethasone はこれら PGs の増加を抑制しなかったとしている。

Gaudet & Levine (1980)<sup>32)</sup> は Mongolian gerbil の一側総頸動脈血流遮断モデルを用いて、IM は不完全虚血による  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  および 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  の増加を抑制したが、脳組織含水量の増加に対しては抑制効果を認めていない。一方、Shohami et al (1982)<sup>69)</sup> は、Albino rat の両側総頸動脈血流遮断に低血圧を負荷したモデルを用いて、IM の効果を検討した結果、IM は総体的に  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TXA}_2$  および  $\text{PGE}_2$  の含有量を低下

させたが、虚血—血流再開によるこれら PGs 代謝には変化を認めず、脳波の回復には著明な効果が認められたと報告している。

以上、文献的に検討して明らかな如く、 $\text{PGI}_2$  や PGs 合成酵素阻害剤を用いた結果は、報告者によって互いに異なっており、虚血性脳細胞障害に対するこれらの試みは、さらに検討が必要である。

著者は、この点を明らかにするために、PGs 代謝に関与する 2 種類の薬剤、すなわち、Dexamethasone (Dexa) および  $\text{TXA}_2$  合成酵素阻害剤 2-Aminomethyl-4-tert-butyl-6-propionylphenol hydrochloride, ONO-3144 (ONO) の前投与による脳組織含水量の変化と、全脳および脳微小血管における PGs 含有量の変化とを対比させて検討した。

脳浮腫の指標としての脳組織含水量の変化では、Dexa 投与群は、対照群と比較して、脳組織含水量の増加が有意に抑制されたのに対して、ONO 投与群では変化がなく、脳浮腫抑制効果は Dexa のみに認められた。

全脳における PGs 代謝では、脳組織含水量の変化をともしない軽度の虚血、すなわち 1 時間虚血では、Dexa, ONO 投与群ともに 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{TXB}_2$  含有量を、虚血中および血流再開後にわたって有意に抑制し、とくに ONO 投与群で著明であったが、脳組織含水量の増加の認められた高度の虚血、すなわち、5 時間虚血では、Dexa 投与群では対照群と比較して、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{TXB}_2$  ともに変化が認められないが、ONO 投与群では、どちらも、虚血中の増加を抑制する一方、虚血後の血流再開後は、むしろ対照群よりも増加させるという変化が認められた。したがって、脳組織含水量の変化と PGs 代謝の変化とは一致しない結果が得られた。

脳微小血管では、5 時間虚血—血流再開 3 時間後の時点では、Dexa 投与によって、 $\text{TXB}_2$  には変化がなく、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  をやや増加させるのに対して、ONO の投与は、 $\text{TXB}_2$  に対しては変化がなく、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  を対照群の 3 倍強の増加作用を示し、特徴的であった。

したがって、この結果によれば、Dexa の脳微小血管の PGs 代謝に与える影響は軽微であるが、ONO では、 $\text{PGI}_2$  合成を促進させる作用を示しており、脳微小血管では、ONO の投与により、虚血後の血流再開による  $\text{PGI}_2$  合成がむしろ増強するといえる。しかしながら、この時点での脳組織含水量の増加は、対照群



とは同様であり、抗浮腫効果が認められないことから、この時点での虚血性脳浮腫発生機構に対する PGs 代謝の関与は否定的であると考えられる。したがって、Dexa の示した抗浮腫作用は、PGs 代謝を介さない他の機構を想定する必要がある。

前述の如く、5時間虚血後の脳微小血管における PGs 代謝は、もはや生理的条件を逸脱しているがために、むしろ、AA の酵素的酸化は抑制された状態にあると考えられる。一方、Dexa は、膜安定化作用により、虚血の刺激による Phospholipids から Phospholipase A<sub>2</sub> による AA の遊離を抑制するといわれている<sup>25,62)</sup>。藤田ら<sup>27)</sup> は、ESR による spin trap によって、AA の自動酸化にともなう遊離基の発生をみており、これが、脂質過酸化の initiation となり得る可能性がある。AA の酵素的過酸化が抑制された状態における AA は、それ自体が脂質過酸化の initiator として作用する<sup>12)</sup>とともに、活性酸素の発生が認められており<sup>14)</sup>、Dexa の示した抗浮腫作用は、この initiator たる AA の細胞膜よりの遊離を抑制することに起因するものであると考えられる。

脳微小血管では、ONO は TXA<sub>2</sub> 合成を抑制すると同時に、PGI<sub>2</sub> 合成を著しく促進している。ONO は TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害の作用の他に、遊離基の Scavenger 効果が想定されており<sup>4)</sup>、PGH<sub>2</sub> の生合成を促進させて hydroperoxide radical を減少させ、結果的に PGI<sub>2</sub> 合成酵素の不活性化を抑制し<sup>63)</sup>、これらの作用があいまって、PGI<sub>2</sub> 合成を促進させていると考えられる。しかし、これらの変化は、全脳としては明らかでなく、対照群に対して、PGI<sub>2</sub> および TXA<sub>2</sub> 合成の維持としてあらわれており、この意味で、ONO は、全脳に対しては AA の酵素的酸化経路の保護作用を有していると推察される。

このような事実より、PGs 合成を阻害することによる抗浮腫効果の試みが必ずしも成功せず<sup>32)</sup>、逆に、脳組織含水量を増加せしめる結果が認められる<sup>42)</sup>のは、むしろ Cyclooxygenase の不活性化による AA の酵素的酸化の抑制は、AA の非酵素的酸化の過程を促進することになり、AA の自動酸化を initiation とする脂質過酸化の促進を招来し、逆効果となると考えられる。この意味で PGs 代謝経路は、生体にとって合目的な、一種の radical 消去機構としてとらえることができると思われる。

#### (C) 脂質過酸化と脳浮腫

生体組織中の過酸化脂質の測定法には種々のものが

あり、(1) 共役ジエン<sup>79)</sup>、(2) Peroxide Value (POV)<sup>94)</sup> (3) エタン、ペンタン<sup>81)</sup>、(4) TBA-RS<sup>103)</sup> 等、過酸化物の生成や分解の各段階に生ずるものを対象としたものが知られているが、いずれも数多くの問題点を含んでおり、決定的なものではない。これらのうちで現在もっともよく利用されているのが TBA-RS 測定法であるが、生体内の種々の物質の影響<sup>75)</sup>や、過酸化物の中でも、TBA に対する反応性の差異が大きい<sup>86)</sup>等、生体組織中の過酸化物を必ずしも総体として正しく表現するものではないとされている。

著者らはこの方法を用いて凍結損傷による脳の TBA-RS の増加、あるいは、局所の脳虚血モデルとしての Compression-Decompression による脳組織 TBA-RS と脳浮腫との関連について実験的に検討し、報告してきた<sup>88)</sup>。その結果、これらの脳細胞障害と過酸化脂質の生成との間には密接な関連性のあることが示唆された。

本研究の虚血脳の結果では、1時間虚血群では TBA-RS の増加が認められず、また、脳組織含水量の増加も認められず、虚血による脳の障害は可逆的であった。一方、5時間虚血群では、脳組織含水量の増加、および血液—脳関門の破綻と一致した TBA-RS の増加が認められ、不完全虚血—血流再開にともなう脳細胞障害に対して、脂質の過酸化が関与していることが示唆された。

虚血後の血流再開によって増加する TBA-RS が何に由来するのかは、非常に重要な問題である。著者の実験結果では、脳組織中の TBA-RS の変動と、PGs の変動との間には、少なくとも正の相関関係は認められず、むしろ、PGs の変動とは逆の変動を示している。PGs は、endoperoxide あるいは hydroperoxide ともに TBA に対する反応性を有しており<sup>80)</sup>、これを考慮すれば、PGs の変動が、TBA-RS の変動にほとんど影響を及ぼしていない原因は、TBA-RS の由来の大部分は、PGs の如く、遊離した過酸化脂質ではなく、リポタンパク質、あるいはタンパク質のヘプチド鎖間にシッフ塩基のかたちでとらえている malondialdehyde あるいはそれに類似の構造物<sup>95)</sup>、すなわち、生体膜の構造物により強く関係した物質の酸化物であろうと考えられる。

したがって、脳組織含水量が増加し、HRP の血管外漏出を認めるような、不可逆的な細胞膜の構造の変化をきたす状態が、この TBA-RS の増加として現われると考えることができる。この意味で、TBA-RS の

増加は、細胞膜の構造破壊を端的に示しているということができる。

著者と同一の虚血モデルを用いた栗原ら<sup>54)</sup>の実験結果では、脳微小血管壁の  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase の活性は、1時間の血流遮断では可逆的な抑制を受けるのに対して、5時間の血流遮断では不可逆的な抑制を受けており、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase が膜酵素であることを考慮すれば、膜構造の破壊を示す TBA-RS の変動と一致して当然であるといえる。

PGs の合成が活発に行なわれている段階で TBA-RS の増加が認められないことは、すなわち、PGs の合成が行なわれるのは、AA の酵素的酸化の系が有効に作動していることを示しており、逆に、AA の酵素的酸化が行なわれない状態では、細胞膜の機能に影響を有する細胞膜構造自体の過酸化一崩壊が起こり、TBA-RS の増加として現われると考えられる。

このような仮説にしたがえば、前述の如く、脳虚血を契機とする phospholipase A<sub>2</sub> の活性化による AA の遊離に対して、酵素的酸化一すなわち、PGs の合成は、むしろ非生理的な非酵素的酸化を誘因とする生体膜構成脂質の過酸化に対する、ある種の生理的防護機構とみなすことができる。

虚血性脳浮腫は、従来 Klatzo<sup>51)</sup> によって分類されてきた Cytotoxic edema と Vasogenic edema の両者の要素を有しており<sup>49)</sup>、脳細胞および血管壁の細胞膜の構造の破壊によって惹起されるものである。したがって、本研究で示した、SHR の両側総頸動脈血流遮断一血流再開のモデルによる虚血性脳浮腫の発生機序は、脳組織含水量の変化、HRP の血管外漏出、脳組織および脳微小血管の PGs 代謝の変動と、脳組織 TBA-RS の変動の諸因子を総合して考察すれば、虚血性脳浮腫の発生機序に対する PGs の関与は小さく、むしろ、TBA-RS の増加として示される細胞膜構造自体の過酸化がより強く関与していることを示唆し、前述の仮説を支持するものである。

## V 結 語

虚血性脳浮腫の発生機構に対する脂質過酸化の関与は、脳組織含水量の変化と TBA-RS の変動とが近似したパターンをとることから、その可能性が想定される。そこで、過酸化脂質の中で、生理的に極めて活性で、互いに相反する作用を有する  $\text{PGI}_2$  および  $\text{TXA}_2$  の代謝を虚血脳および虚血脳の微小血管について検討を加えた。

その結果、虚血脳では、脳組織含水量の増加を認めない程度の、可逆的虚血によって、全脳としての PGs は虚血後の血流再開により一過性に急激な合成の亢進を認めたが、 $\text{PGI}_2$ 、 $\text{TXA}_2$  との間には差が認められなかった。しかし、脳微小血管では、 $\text{TXA}_2$  合成の増加と、 $\text{PGI}_2$  合成の減少が明らかで、虚血に対して、脳微小血管での PGs 代謝は著るしく  $\text{TXA}_2$  合成優位へと変化した。一方、脳組織含水量の増加をともなった高度な虚血状態のもとでは、全脳においても、また、脳微小血管においても、 $\text{PGI}_2$ 、 $\text{TXA}_2$  とともに合成が抑制され、虚血によって遊離された AA は、むしろ、非酵素的な過酸化を受けると考えられた。

Dexamethasone の前投与は、脳組織含水量の増加を抑制し、抗浮腫作用を示したが、PGs 代謝に対しては影響を及ぼさなかった。一方、 $\text{TXA}_2$  合成酵素阻害剤 ONO-3144 は、脳微小血管の  $\text{TXA}_2$  合成を抑制し、逆に、 $\text{PGI}_2$  合成を著るしく促進する作用を示したか、抗浮腫作用は示さなかった。

これらの事実から、PGs 代謝の変動は、虚血性脳浮腫の発生機構に対する関与は小さいと考えられる。しかし、虚血による PGs 代謝の変動、ことに、脳微小血管における  $\text{PGI}_2$  優位から、 $\text{TXA}_2$  合成優位への変化は、脳微小循環不全を招来し、脳虚血状態を一層増大させることが推察された。

したがって、Dexamethasone の示した抗浮腫作用は、PGs 代謝を介するものではなく、膜安定化作用、すなわち、phospholipase A<sub>2</sub> 活性の賦活化を抑制し、AA の遊離を減少させ、結果的に AA の非酵素的酸化を抑制することによってもたらされたものと考えられる。

これらの事実より、虚血性脳浮腫の発生には、PGs の如き遊離した過酸化脂質よりはむしろ、TBA-RS の増加として示される細胞膜の構成要素自体の脂質過酸化が重要な関与を有していると結論された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った半田 隆教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始、御指導を頂いた倉敷中央病院脳神経外科、藤田雄三博士に深謝致します。

また、研究施設の利用を快諾され、あわせて御指導を賜った長崎大学医学部第2薬理学教室、尾崎正若教授、丹羽正美助教授、および、和歌山県立医科大学第1病理学教室、大島章教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Abdel-Halim MS, Hamberg M, et al: Identification of Prostaglandin D<sub>2</sub> as a major prostaglandin in homogenates of rat brain.

- Prostaglandins **14**: 633-643, 1977.
- 2) Abdel-Halim MS, Lundén I, et al: Prostaglandin profiles in nervous tissue and blood vessels of the brain of various animals. *Prostaglandins* **19**: 249-258, 1980.
  - 3) Abdel-Halim MS, Holst H, et al: Prostaglandin profiles in tissue and blood vessels from human brain. *J Neurochem* **34**: 1331-1333, 1980.
  - 4) Aishita H, Morimura T, et al: ONO-3144, a new anti-inflammatory drug and its possible mechanism of action. *Arch Int Pharmacodyn* **261**: 316-327, 1983.
  - 5) Ames A III, Wright RL, et al: The no reflow phenomenon. *Am J Pathol* **52**: 437-453, 1968.
  - 6) 浅野孝雄, 佐々木富男, et al: 脂質過酸化と脳血管攣縮. *脳神経* **33**: 33-46, 1981.
  - 7) Awad I, Little JR, et al: Treatment of acute focal cerebral ischemia with prostacyclin. *Stroke* **14**: 203-209, 1983.
  - 8) Bazán NG Jr: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim Biophys Acta* **218**: 1-10, 1970.
  - 9) Bhakoo KK, Crockard A, et al: Prostaglandin synthesis and oedema formation during reperfusion following experimental brain ischaemia in the gerbil. *Stroke* **15**: 891-895, 1984.
  - 10) Bosio E, Galli C, et al: Correlation between release of free arachidonic acid and prostaglandin formation in brain cortex and cerebellum. *Prostaglandins* **11**: 773-781, 1976.
  - 11) Branston NM, Strong AJ, et al: Extracellular potassium activity, evoked potential and blood flow; Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex. *J Neurol Sci* **32**: 305-321, 1977.
  - 12) Brendel K, Meezan E, et al: Isolated brain microvessels: A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science* **185**: 953-955, 1974.
  - 13) Chan PH and Fishman RA: Brain edema: Induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* **201**: 358-360, 1978.
  - 14) Chan PH and Fishman RA: Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* **35**: 1004-1007, 1980.
  - 15) Choki J, Yamaguchi T, et al: Effect of carotid artery ligation on regional cerebral blood flow in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Stroke* **8**: 374-379, 1977.
  - 16) Crockard HA, Ianotti F, et al: Cerebral blood flow and oedema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* **11**: 494-498, 1980.
  - 17) Crockard HA, Bhakoo KK, et al: Regional prostaglandin levels in cerebral ischaemia. *J Neurochem* **38**: 1311-1314, 1982.
  - 18) Demopoulos HB: The basis of free radical pathology. *Fed Proc* **32**: 1859-1861, 1973.
  - 19) Demopoulos HB, Flam ES, et al: Molecular pathology of lipids in CNS membranes. In *Oxygen & Physiological Function*, edited by Jöbsis FF, Dallas, Professional Information Library, 1977 pp. 491-508.
  - 20) Demopoulos HB, Flamm ES, et al: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (suppl)* **492**: 91-119, 1980.
  - 21) Dougherty JH Jr, Levy DE, et al: Experimental cerebral ischemia produces platelet aggregates. *Neurol* **29**: 1460-1465, 1979.
  - 22) Ellis EF, Nies AS, et al: Cerebral arterial smooth muscle contraction by thromboxane  $A_2$ . *Stroke* **8**: 480-483, 1977.
  - 23) Flamm ES, Demopoulos HB, et al: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* **9**: 445-447, 1978.
  - 24) Flower RJ: Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol Rev* **26**: 33-67, 1974.
  - 25) Flower RJ and Blackwell GJ: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase  $A_2$  inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* **278**: 456-459, 1979.
  - 26) Fujishima M, Ishitsuka T, et al: Changes in local cerebral blood flow following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Stroke* **12**: 874-876, 1981.
  - 27) 藤田雄三, 新宮 正: スピントラップ法による生体試料の分析. 一虚血脳の過酸化ラジカル. 第5回臨床医学のための磁気共鳴研究会抄録集 pp 9-14, 1983.
  - 28) Furlow TW Jr and Hallenbeck JM: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog's brain after global ischemia. *Stroke* **9**: 591-594, 1978.
  - 29) Garcia JH: Experimental ischemic stroke: A review. *Stroke* **15**: 5-14, 1984.
  - 30) Gaudet RJ and Levine L: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem Biophys Res Commun* **86**: 893-901, 1979.
  - 31) Gaudet RJ, Alam I, et al: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J Neurochem* **35**: 653-658, 1980.
  - 32) Gaudet RJ and Levine L: Effect of unilateral common carotid artery occlusion on levels of prostaglandins  $D_2$ ,  $F_{2\alpha}$  and 6-keto-prostaglandin

- $F_{1\alpha}$  in gerbil brain. *Stroke* **11**: 648-652, 1980.
- 33) Goehrlert U.G., Ng Ying Kin N.M.K., et al: Biosynthesis of prostacyclin in rat cerebral microvessels and the choroid plexus. *J Neurochem* **36**: 1192-1201, 1981.
- 34) Granström E and Samuelsson B: Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: General considerations. In *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. Volume 5, edited by Frolich J.C., New York, Raven Press, 1978 pp. 1-13.
- 35) Gréen K, Granström E, et al: Methods for quantitative analysis of  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGE_2$ ,  $9\alpha,11\alpha$ -Dihydroxy-15-keto-prost-5-enoic acid and  $9\alpha,11\alpha,15$ -Trihydroxy-prost-5-enoic acid from body fluids using deuterated carriers and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* **54**: 434-453, 1973.
- 36) Gréen K and Hagenfeldt K: Prostaglandins in the human endometrium. Gas chromatographic-mass spectrometric quantitation before and after IUD insertion. *Am J Obstet Gynecol* **122**: 611-614, 1975.
- 37) Gryglewski R.J., Nowak S., et al: Treatment of ischaemic stroke with prostacyclin. *Stroke* **14**: 197-202, 1983.
- 38) Hagen A.A., White R.P., et al: Synthesis of prostaglandins and thromboxane  $B_2$  by cerebral arteries. *Stroke* **10**: 306-309, 1979.
- 39) Hallenbeck J.M. and Furlow T.W.Jr: Prostaglandin  $I_2$  and Indomethacin prevent impairment of post-ischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke* **10**: 629-637, 1979.
- 40) Ham E.A., Egan R.W., et al: Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase. *J. Biol Chem* **254**: 2191-2194, 1979.
- 41) Hamberg M and Samuelsson B: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Nat Acad Sci USA* **71**: 3400-3404, 1974.
- 42) Harris R.J., Bayhan M., et al: Modulation of the pathophysiology of primate focal cerebral ischaemia by indomethacin. *Stroke* **13**: 17-24, 1982.
- 43) Hossmann K.A. and Kleihues P: Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol* **29**: 375-382, 1973.
- 44) Hossmann V., Hossmann K.-A., et al: Effects of intravascular platelet aggregation on blood recirculation following prolonged ischemia of the cat brain. *J Neurol* **222**: 159-170, 1980.
- 45) Iannotti F., Crockard A., et al: Are prostaglandins involved in experimental ischemic edema in gerbils? *Stroke* **12**: 301-306, 1981.
- 46) 入野忠芳, 種々田 護, et al: 臨床症状よりみた脳梗塞の血流再開. *脳神経* **27**: 303-308, 1975.
- 47) Ito U., Ohno K., et al: Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. *Stroke* **10**: 542-547, 1979.
- 48) Jouvenaz G.H., Nugteren D.H., et al: Gas chromatographic determination of nanogram amounts of prostaglandins E and F. *Prostaglandins* **3**: 175-187, 1973.
- 49) Katzman R., Clasen R., et al: Report of joint committee for stroke resources: IV. Brain edema in stroke. *Stroke* **8**: 512-540, 1977.
- 50) Kerckhoff W., Hossmann K.-A., et al: No effect of prostacyclin on blood flow, regulation of blood flow and blood coagulation following global cerebral ischemia. *Stroke* **14**: 724-730, 1983.
- 51) Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropath Exp Neurol* **26**: 1-14, 1967.
- 52) Kogure K., Morooka H., et al: Involvement of lipid peroxidation in postischemic brain damage. *Neurol* **29**: 546, 1979.
- 53) Kontos H.A., Wei E.P., et al: Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin  $G_2$ . *Science* **209**: 1242-1245, 1980.
- 54) 栗原正紀, 河野輝昭, et al: 虚血性脳浮腫と細胞膜障害—脳微小血管  $Na^+-K^+$  ATPase 活性変動より—, *脳虚血とフリーラジカル*, 浅野孝雄 (編) 東京, にっころん社 1983, pp 200-205.
- 55) Lands W.E. and Samuelsson B: Phospholipid precursor of prostaglandins. *Biochem Biophys Acta* **164**: 426-429, 1968.
- 56) Lands W.E.: The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Ann Rev Physiol* **41**: 633-652, 1979.
- 57) Levine L. and Van Vunakis H: Antigenic activity of prostaglandins. *Biochem Biophys Res Commun* **41**: 1171-1177, 1970.
- 58) Lowry O.H., Rowebrough N.J., et al: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
- 59) Matakas F., Cuypers J., et al: Disturbances of cerebral microcirculation after the cerebral ischemia. *Neuropathol Pol* **13**: 515-518, 1975.
- 60) Maurer P., Moskowitz M.A., et al: The synthesis of prostaglandins by bovine cerebral microvessels. *Prostaglandins Med* **4**: 153-161, 1980.
- 61) McIlwain H. and Bachelard H.S.: *Biochemistry and the Central Nervous System*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971.
- 62) Mitamura J.A., Seligman M.L., et al: Loss of essential membrane lipids and ascorbic acid from rat brain following cryogenic injury and protection by methylprednisolone. *Neurol Res* **3**: 329-344, 1981.
- 63) Moncada S., Gryglewski R., et al: An enzyme

- isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665, 1976.
- 64) Moncada S, Gryglewski RJ, et al: A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**: 715-737, 1976.
  - 65) Moncada S, Ferreira SH, et al: Bioassay of prostaglandins and biologically active substances derived from arachidonic acid. In *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Volume 5, edited by Frölich JC, New York, Raven Press, 1978, pp. 211-237.
  - 66) Moncada S and Vane JR: The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* **38**: 61-71, 1979.
  - 67) Moncada S and Vane JR: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Review* **30**: 293-331, 1979.
  - 68) Moskowitz MA and Coughlin SR: Clinical applications of prostaglandins and their inhibitors. *Stroke* **12**: 882-886, 1981.
  - 69) Mršulja BB, Djuričić BM, et al: Biochemistry of experimental ischemic brain edema. *Adv Neurol* **28**: 217-230, 1980.
  - 70) Needleman P, Moncada S, et al: Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A<sub>2</sub> from prostaglandin endoperoxides. *Nature* **261**: 558-560, 1976.
  - 71) Nicosia S and Galli G: A mass fragmentographic method for the quantitative evaluation of brain prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **9**: 397-403, 1975.
  - 72) Nordström C-H, Rehncrona S, et al: Effects of phenobarbital in cerebral ischemia. Part II: Restitution of cerebral energy state, as well as of glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids after pronounced incomplete ischemia. *Stroke* **9**: 335-343, 1978.
  - 73) Ogata J, Fujishima M, et al: Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: A pathological study. *Stroke* **7**: 54-60, 1976.
  - 74) Ohkawa H, Ohishi N, et al: Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351-358, 1979.
  - 75) 岡部結明, 山本妙子, et al: 老化と過酸化脂質測定の問題点. *過酸化脂質研究* **3**: 9-13, 1979.
  - 76) Pangnamlala RV, Sharma HM, et al: Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **11**: 599-607, 1976.
  - 77) Pappius HM and Wolfe LS: Some further studies on vasogenic edema. In *Dynamics of Brain Edema*, edited by Pappius HM and Feindel W, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1976, pp. 138-143.
  - 78) Pickard JD, McDonnell LA, et al: Response of the cerebral circulation to changing perfusion pressure after indomethacin. *Circ Res* **40**: 198-203, 1977.
  - 79) Recknagel RO and Ghoshal AK: Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab Invest* **15**: 132-146, 1966.
  - 80) Rehncrona S, Westerberg E, et al: Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem* **38**: 84-93, 1982.
  - 81) Riely CA, Cohen G, et al: Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation. *Science* **183**: 208-210, 1974.
  - 82) Rosenblum WI and El-Sabban F: Platelet aggregation in the cerebral microcirculation. Effects of aspirin and other agents. *Circ Res* **40**: 320-328, 1977.
  - 83) Ruszczewski P and Herbaczynska-cedro K: Release of prostaglandin-like substances into cerebral venous blood in the conditions injurious to brain in the dog. *Acta Physiol Pol* **29**: 489-499, 1978.
  - 84) Segawa H and Patterson RH Jr: Role of platelets in vasogenic brain edema. I. Significance of thrombus formation in the damaged vessels. *Arch Neurol* **38**: 265-270, 1981.
  - 85) Seligman ML, Flamm ES, et al: Spectrofluorescent detection of malonaldehyde as a measure of lipid free radical damage in response to ethanol potentiation of spinal cord trauma. *Lipids* **12**: 945-950, 1977.
  - 86) 清水孝雄, 近藤規之, et al: TBA 反応と Prostaglandin Endoperoxides. *過酸化脂質研究* **3**: 23-27, 1979.
  - 87) 清水孝雄: 神経細胞とプロスタグランディン. *臨床科学* **17**: 1014-1021, 1981.
  - 88) 新宮 正, 半田 肇, et al: 脳浮腫に対する遊離基の関与について. 一臨床的, 実験的考察— *Neurol Med-chir (suppl)* **20**: 105-106, 1980.
  - 89) Shohami E, Rosenthal J, et al: The effect of incomplete cerebral ischemia on prostaglandin levels in rat brain. *Stroke* **13**: 494-499, 1982.
  - 90) Siesjö BK: *Brain Energy Metabolism*. New York, John Wiley, 1978.
  - 91) Siesjö BK: Cell damage in the brain:

- A speculative synthesis. *J Cerebral Blood Flow Metabol* **1**: 155-185, 1981.
- 92) Spagnuolo C, Sauterbin L, et al: PGF<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub> and HETE levels in gerbil brain cortex after ligation of common carotid arteries and decapitation. *Prostaglandins* **18**: 53-61, 1979.
- 93) Suzuki O and Yagi K: Formation of lipoperoxide in brain edema induced by cold injury. *Experientia* **30**: 248, 1974.
- 94) Swoboda PAT and Lea CH: Determination of the peroxide value of edible fats by colorimetric iodometric procedure. *Chem Ind* **77**: 1090-1091, 1958.
- 95) 植田伸夫: 過酸化脂質と疾患, 過酸化脂質実験法, 金田尚志他(編)東京, 医歯薬出版, 1983, pp 223-227.
- 96) Valhov V: The role of prostaglandins in regulation of vessel wall reactivity. In *The Cerebral Vessel Wall*, edited by Cervós-Navarro J, et al: New York, Raven Press, 1976. pp. 143-147.
- 97) Veno A, Tanaka K, et al: Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>. *Prostaglandins* **21**: 637-647, 1981.
- 98) Volpi M, Naccache PH, et al: Arachidonate metabolite(s) increase the permeability of the plasma membrane of the neutrophil membranes to calcium. *Biochem Biophys Res Commun* **92**: 1231-1237, 1980.
- 99) Weksler BB, Marcus AJ, et al: Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3922-3926, 1977.
- 100) Wolfe LS, Rostworowski K, et al: The endogenous biosynthesis of prostaglandins by brain tissue in vitro. *Can J Biochem* **54**: 629-640, 1976.
- 101) Wolfe LS, Rostworowski K, et al: Endogenous formation of the prostaglandin endoperoxide metabolite, thromboxane B<sub>2</sub>, by brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **70**: 907-913, 1976.
- 102) Wolfe LS: The role of prostaglandins in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* **41**: 669-684, 1979.
- 103) Yagi K: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood. *Biochem Med* **15**: 212-216, 1976.
- 104) 山本光生, 島 健, et al: 脳虚血における過酸化脂質の生成—不可逆的細胞障害への関与について—, 脳虚血と細胞障害—活性酸素とフリーラジカルの関与—, 浅野孝雄(編)東京, にゅーろん社 1980, pp 59-65.
- 105) Yoshida S, Inoh S, et al: Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. Lipid peroxidation as a possible cause of postischemic injury. *J Neurosurg* **53**: 323-331, 1980.